[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1080657A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93106352.3

[51]Int.Cl[5]

C12P 13/02

[43]公开日 1994 年 1 月 12 日

[22]申请日 93.4.30

[30]优先权

[32]92.4.30 [33]JP[31]111265/92

[71]申请人 住友化学工业株式会社

地址 日本大阪府

[72]发明人 高岛喜树 熊谷和夫 光田贤

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利代理部

代理人 黄革生

C12N 1/20

//(C12P 13/02,C12R 1:01)

说明书页数: 附图页数:

[54]发明名称 酰胺化合物的生产方法以及其中使用的微生物

[57]摘要

披露出一种生产酰胺化合物的方法，其包括使用细菌细胞的肉汤培养液、细菌细胞或通过处理细菌细胞能够获得的物质将腈化合物转化成酰胺化合物；该细菌细胞是具有转化腈化合物为酰胺化合物的活性的土壤杆菌属（Agrobacterium radiobacfer sc-c15-1）的微生物细胞。此外，还披露出具有转化腈化合物为酰胺化合物活性的土壤杆菌属微生物（Agrobacterium，这种微生物可以用于本发明方法之中。

权利要求书

1．一种生产酰胺化合物的方法，其包括使用细菌细胞的肉汤培养液、细菌细胞或通过处理细菌细胞能够得到的物质，将腈化合物转化为酰胺化合物，所说的细菌细胞是土壤杆菌属（Agrobacterium）微生物的细胞，这种细胞具有转化腈化合物为酰胺化合物的活性。

2．按照权利要求1的方法，其中所说的土壤杆菌属微生物是Agrobacterium radiobacter SC-C15-1（FERM BP-3843，CCTCC 93012）或其突变体。

3．按照权利要求1的方法，其中所说的腈化合物选自：正丁腈、正戊腈、异丁腈、乙腈、新戊腈、2-氯丙腈、丙烯腈、丁烯腈、甲基丙烯腈、苄腈、2-氰基吡啶、3-氰基吡啶、4-氰基吡啶、丙二腈、丁二腈和己二腈。

4．一种具有转化腈化合物为酰胺化合物的活性的土壤杆菌属微生物。

5．按照权利要求4的微生物，其是 Agrobacterium radiobacter SC-C15-1（FERM BP-3843，CCTCC 93012）或其突变体。

说　明　书

酰胺化合物的生产方法以及其中使用的微生物

本发明涉及酰胺化合物的产生方法及此方法中使用的微生物。

近年来，微生物等生物催化剂大量地被用于化学反应。例如，众所周知腈化合物可以用特殊微生物转化成酰胺化合物。

这样的转化反应过程的实例是利用下列微生物的那些过程：杆菌属（ Bacillus ）、无芽孢杆菌属（ Bacteridium ）、微球菌属（ Micrococcus ）或短杆菌属（ Brevibacterium ）（US 4001081）；棒状杆菌属（ Corynebacterium ）或诺卡氏菌属（ Nocardia ）（US 4248968）；假单孢菌属（ Pseudomonas ）（US 4555487）；红球菌属（ Rhodococcus ）或微杆菌属（ Microbacferium ）（EP-A-188316（公开））和镰孢霉属（ Fusarium ）（日本专利公开No．86899／1989）。

如上讨论的那样，已知几种对腈化合物转化为酰胺化合物具有活性的微生物，但是仍然需要开发利用具有改进的效果的微生物的生产酰胺化合物的改进方法。

在这些情况下，本发明人广泛研究了对转化腈化合物为酰胺化合物具有更活性的微生物的性质；结果发现，自京都府某地土壤中离析出的土壤杆菌属（ Agrobacterium ）微生物对于腈化合物的腈基具有水合作用，并且能够高效地将腈化合物转化为酰胺化合物，因而完

成了本发明。

也就是说，本发明提供一种生产酰胺化合物的方法，其特征在于使用一种土壤杆菌属（ Agrobacterium ）微生物的腈化合物转化为酰胺化合物，这种微生物对转化腈化合物为酰胺化合物具有活性，其使用形式为：细菌细胞的肉汤培养液、细菌细胞或处理细菌细胞能够得到的物质。

本发明还提供一种在此生产方法中使用的微生物，其中包括其突变体。

按照本发明的方法可以将各种腈化合物转化为酰胺化合物。所说腈化合物的实例是脂族腈（例如正丁腈、正戊腈、异丁腈、乙腈和新戊腈等）、含一个或多个卤原子的腈化合物（如2－氯丙腈等）、不饱和脂族腈化合物（如丙烯腈、丁烯腈和甲基丙烯腈等）、氨基腈化合物（如2－苯基甘氨基腈等）、羟基腈化合物（如丙醇腈和扁桃腈等）、芳族腈化合物（如苄腈和氰基吡啶等）和二腈化合物（如丙二腈、丁二腈和己二腈等）。优选正丁腈、正戊腈、异丁腈、乙腈、新戊腈、2－氯丙腈、乙烯腈、丁烯腈、甲基丙烯腈、苄腈、2－氰基吡啶、3－氰基吡啶、4－氰基吡啶、丙二腈、丁二腈和己二腈。

腈化合物转化为酰胺化合物的过程，通过采用对转化腈化合物为酰胺化合物具有活性的土壤杆菌属（ Agrobacterium ）微生物而达到。在土壤杆菌属微生物之中，优选 Agrobacterium radiobacter SC－C15－1菌株，本发明人已发现此菌株具有使腈化合物的腈基水合的高活性，并按布达佩斯条约规定于1992年4月23日被保藏在工业科技署的“发酵研究所”（现更名为“国家生物科学和人类技术研究所”），保藏号为 FERM

BP-3843； Agrobacterium radibacter SC-C15-1菌株还于1993年4月15日保藏在“中国典型培养物保藏中心”（CCTCC），保藏号为CTTCC93012。

下面将说明 Agrobacterium radiobater SC-C15-1的细菌学性质：

（a）形态学

1．细胞的形状和尺寸

形状：棒状

尺寸：0.5-0.8×0.8-2μm

2．多形性：无

3．游动性：活泼的，具周鞭毛的

4．孢子形成：无

5．革兰氏染色：阴性

6．抗酸性：无

（b）生长性质

1．肉汤琼脂平板培养：

圆形、凸面、无光泽、淡褐色

2．肉汤琼脂斜面培养：

无光泽、淡褐色

3．肉汤液培养：均一混浊生长

4．肉汤明胶穿刺培养：未液化

5．石蕊牛乳：稍有凝固

（c）生理学性质：

1．硝酸还原作用：+

2．脱氮作用：±～+

3．MR试验：－

4．Vp试验：+

5．吲哚形成试验：－

6．硫化氢形成试验：+

7．淀粉水解试验：－

8．柠檬酸盐利用试验

科泽氏（ kosor）柠檬酸盐培养基：+

科里斯顿辛 Christensen 柠檬酸盐培养基：+

9．无机氮源利用试验

$NaNO_3$：+

$(NH_4)_2SO_4$：+

10．色素形成试验：

king A介质：－

king B介质：－

11．尿素酶：+

12．氧化酶：+

13．催化酶：+

14．生长条件

PH：6．2－9．6

温度：4－39℃

15．对氧的态势：需氧的

16．O－F试验：0

17．由糖形成酸和气体的试验

	酸	气体
L－阿拉伯糖	+	－
D－木糖	+	－
D－葡萄糖	+	－
D－甘露糖	+	－
D－果糖	+	－
D－半乳糖	+	－
麦芽糖	+	－
蔗糖	+	－
乳糖	+	－
海藻糖	+	－
D－山梨糖醇	+	－
D－甘露糖醇	+	－
肌醇	±	－
甘油	+	－
淀粉	－	－

（d）其它性质

1．聚（β－羟基丁酸）积累作用：－

2．藻蛋白碱二水化酶试验：+

3．气相色谱（GC）含量：58．7%

本发明人将这些特性和“ Bergey 's Manual of Systematic Bacteriolgy ”（1984）中披露的性质相比后，将此微生物鉴定为 Agrobacterium radiobacter 。

应当指出，迄今，尚无人知道土壤杆菌（ Agrobacterium ）属微生物具有转化腈化合物为酰胺化合物的活性。就此而论，本发明的微生物 Agrobacterium radiobacter SC-C15-1被视为一种新菌株。此外，此菌株的任何变异性（即由 Agrobacterium radiobacter SC-C15-1衍生得到的任何突变体）、任何细胞融合菌株或重组菌株也都是本发明方法适用的。

在本发明方法中使用的微生物培养物，可以在各种含碳源和氮源、有机和/或无机盐等的介质中制备，这些物质广泛地用于制备普通细菌的培养物。

所说碳源的实例是葡萄糖、甘油、糊精、蔗糖、动植物油、糖蜜等。所说氮源的实例是有机和无机氮源，如肉汤、胨、酵母抽提物、麦芽汁、大豆粉、玉米浆、棉籽粉、干酵母、酪蛋白氨基酸、氯化铵、硝酸钠、硝酸铵、硫酸铵、乙酸铵和尿素等。

有机和无机盐的实例是下列元素氯化物、硫酸盐、乙酸盐、碳酸盐和磷酸盐，例如钾、钠、钙、镁、铁、锰、钴、铜和锌等的上述盐。其具体例是氯化钾、氯化钠、硫酸镁、硫酸亚铁、硫酸锰、氯化钴、硫酸锌、硫酸铜、乙酸钠、碳酸钙、碳酸钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠。

在本发明方法中，优选向所说的培养介质中加入如异戊腈和丁烯腈的腈化合物或如丁烯酰胺的酰胺化合物以提高其中所用微生物水合腈基的活性。例如，这些化合物可以每100ml 培养介质中使用大约10mg至大约1克。

本发明方法中使用的微生物培养物，按对于普通细菌使用的传统方法制备，例如用试管、往复或旋转振荡器振荡培养物的方法制成固

体或液体培养物以及用罐式发酵器或发酵罐等制成其它培养物。

所说的微生物培养物通常在需氧的条件下培养。尤其是在使用罐式发酵器或发酵罐时，必须向其中通入无菌空气，通气速度通常约为每分钟通入0．1－2倍培养液体积的空气。

培养温度可以在所用微生物于培养液中存活的温度范围内变化。例如，约在20－40℃，优选约在25－35℃温度下培养此培养液。介质PH优选控制在大约6－8。

培养期间长短可以依各种条件而改变，一般优选培养该培养液不少于大约1－7天。

本发明方法例如实施如下。

将按上述方式制备的该微生物细菌细胞的肉汤培养液、细菌细胞或者通过处理所说细菌细胞能够得到的物质悬浮在水中或者悬浮在如磷酸盐缓冲溶液的水溶液中，使此悬浮液与腈化合物反应。

本文中使用的术语“通过处理细菌细胞能够得到的物质”，是指通过超声波分解、均化或用法国压机分裂之类传统方法得到的分裂的细菌细胞或其中所含的酶，或者指按照如载体支持法或包藏法之类的制动方法，在未处理过或分裂过的细菌细胞或其中所含的酶以容易除去的状态被不溶化之后，通过使之制动的方式能够获得的制动制剂；所谓载体支持法是指通过共价键、离子键、吸附等方式使这些物质支持在适当载体上的方法，所谓包藏法是指使这些物质夹杂在聚合物网状结构之中的方法。

通常在大约0．01－20wt%，优选大约0．01－10wt%浓度下使用所说的细菌细胞或通过处理细菌细胞能够获得的物质。在酶或制动制剂的情况下，其浓度可以视其纯度或所用的制动方法而变

化；例如，优选制成这样一些酶和制动制剂，他们使腈基水合的活性与所说的细菌细胞或通过处理所说的细菌细胞能够得到的物质所具有的活性相似。所说的细菌细胞的肉汤培养液在加到腈化合物中之前无需进一步处理就可以使用。最好将所说细菌细胞的肉汤培养液稀释或浓缩以使之水合腈基的活性与所说的细菌细胞或通过处理所说的细菌细胞能够得到的物质所具有的活性相似。

此反应通常在大约0－50℃（优选在大约0－30℃）温度下和大约6－10PH（优选大约7－9PH）下进行大约10分钟－48小时。当PH被控制在上范围之内时，所说的细菌细胞能够使形成的酰胺化合物在反应混合物中积累到很高的浓度。

可以利用本领域中已知的任何传统方法从反应混合物中回收形成的酰胺化合物。例如，所说的细菌细胞或者通过处理所说的细菌细胞能够得到的物质用离心之类方法从反应混合物分离之后，用活性炭或离子交换树脂处理以便除去杂质。提纯过的混合物用减压蒸馏或蒸发法浓缩后，用甲醇等有机溶剂使析出的晶体重结晶，以便获得所需的酰胺化合物。

本发明通过下列不是用于限制其范围的实施例将被进一步详细说明。

实施例1（细菌细胞的离析）

在京都府某地收集土壤，将其加到其中含磷酸钾（0.3wt%）、磷酸氢二钾（0.7wt%）、葡萄糖（0.2wt%）、柠檬酸钠（0.05wt%）、碳酸镁（0.01wt%）、硫酸亚铁（0.005wt%）、硫酸锰（0.005wt%）、氯化钴（0.005wt%）、硫酸锌（0.005wt%）、维他命（极少量）和各种腈化合物

（0.05-0.5wt%）的培养介质（PH7.0）中，然后用往复式振荡器30℃下振荡培养液21天。将一部分这种肉汤培养液分布在含上述同样成分的琼脂介质上，培养此培养液以形成一些菌落，从中筛选具有水合腈基活性的某种菌株，这样获得了Agrobacterium radiobacter SC-C15-1菌株，它是一种对于水合腈基具有较高活性的细菌菌株。

实施例2（细菌细胞的肉汤培养液）

在一只500ml坂口（Sakaguchi）烧瓶中置入一种经杀菌的培养介质（100ml，PH7.2），其中含甘油（1.0wt%）、多胨（0.5wt%）、酵母提取物（0.3wt%）、麦芽汁（0.3wt%）、异戊腈（0.1wt%）、硫酸亚铁（0.001wt%）、硫酸锰（0.001wt%）、氯化钴（0.001wt%）和硫酸锌（0.001wt%）。在此烧瓶中用1ml Agrobacterium radiobacter SC-C15-1肉汤培养液（已在上述同样的培养介质中培养过）接种。此烧瓶在30℃下以135次／分速度往复振荡培养2天，得到细菌细胞的肉汤培养液。

实施例3（反应1）

向实施例2中获得的细菌细胞的肉汤培养液（50ml）中加入丙烯腈（1.11克，21.0mmol），在用电磁搅拌器搅拌下在20℃使反应进行。反应引发后3小时，取出一份（1.0ml）反应混合物，加入2NHCl（0.1ml）中止此份反应液中的反应。在下述条件下用气相色谱法分析此反应混合物；分析结果说明，所加入的丙烯腈全部转化为丙烯酰胺，而且未发现丙烯酸之类副产物。

气相色谱分析条件：

柱：填充柱

载体： Porapak Q型（80－100目）

长度：1．1米

柱温度：210℃

载气流速：50ml／分

样品注射体积：2μl

实施例4（反应2）

用离心法（10000×g，10分钟）从实施例2得到的Agrobacterium radiobacter SC－C15－1细菌细胞的肉汤培养液（100ml）中收集细菌细胞，用0．05M磷酸盐缓冲液（PH7．7）洗涤所收集到的细菌细胞，将其悬浮在洗涤用同样的缓冲液（50ml）中。向此悬浮液中按一定方式分三次加入丙烯腈（6．62克，125mmol），使其浓度不超过5wt%。在电磁搅拌器搅拌下使反应在20℃下进行。反应引发后经23小时，取出一份（1．0ml）反应混合物，加入2NHCl（0．1ml）于此份反应混合物中停止反应。用气相色谱法，在与实施例3所述同样条件下分析此反应混合物，分析结果说明，所加入的丙烯腈全部转化为丙烯酰胺，而且未发现丙烯酸之类的副产物。

实施例5（回收率）

用离心法（10000×g，10分钟）从实施例4得到的反应混合物中取出细菌细胞。在低于50℃温度下蒸馏浓缩上清液，析出的晶体从甲醇中重结晶得到所需的酰胺化合物（8．2克，115mmol，产率92%），为无色板状晶体。通过测定熔点、元素分析、红外光谱和核磁共振谱证明，这些晶体是丙烯酰胺。

实施例6（粗酶溶液的制备）

用离心法（１００００×ｇ，１０分）从在实施例２中得到的Agrobacterium radiobacter ＳＣ－Ｃ１５－１细菌细胞的肉汤培养液（８Ｌ）中收集细菌细胞。洗涤后，将这些细菌细胞悬浮在０．０５Ｍ的ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ缓冲液（３００ml，ＰＨ７．２）中，并用法国压机（２００００磅／英寸^2）分解两次。离心（１００００×ｇ，１０分）此分裂的细胞，除去残留的细菌细胞。用渗析管（Ｗａｋｏ纯化学工业有限公司）在４℃对四次更换的１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ缓冲液（ＰＨ７．２）渗析上清液２４小时。使渗析液通过一只ＤＥＡＥ－ Sepharose ＦＦ（ pharmacia ）阴离子将交换树脂柱（５０mm直径，２００mm长）（此树脂事先用０．０５Ｍ ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ缓冲液，ＰＨ７．２，平衡过），从而使酶在树脂上吸附。

然后在此柱中通过０．０５Ｍ ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ缓冲液（ＰＨ７．２）洗涤，用含０－１．０Ｍ氯化钾的０．０５Ｍ ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ 缓冲液（ＰＨ７．２）进行梯度洗脱。回收显示出水合腈基活性的馏份后，用渗析管（Ｗａｋｏ纯化学工业有限公司）在４℃对四次更换的１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ缓冲液（ＰＨ７．２）渗析２４小时。渗析液在与上述相同的条件下用阴离子交换色谱法提纯，但是在梯度洗脱时使用含０．２－０．８Ｍ氯化钾的０．０５ｍＭ ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ缓冲液（ＰＨ７．２）。按照与上述相同的方式渗析此洗脱液，得到粗酶溶液。

水合腈基的活性测定如下。

将粗酶溶液样品（１ml）加到１００ｍＭ的含水丙腈中（９ml，

PH7．7），使反应在10℃下进行。10分钟后加入2NHCl（1ml）停止此反应，用气相色谱法分析反应混合物样品以确定所生产的丙酰胺量。

下文所用的酶活性单位按这样方式定义，即每分钟将1μmol丙腈转化为丙酰胺的活性定义为1个活性单位（U）。

实施例7（反应3）

本例中检验了 Agrobacterium radiobacter SC-C15-1中所含的腈水合酶对于将各种腈化合物转化为相应酰胺化合物的能力。为此，向实施例6中得到的粗酶溶液（50U）中，加入0.05M磷酸盐缓冲溶液（10ml，PH7．7）和每种表1中所示的试验用腈化合物（1mmol）作为基质，使反应在30℃下进行1小时。结果发现，在 Agrobacterium radiobacter SC-C15-1中所含的腈水合酶，具有将各种试验的腈化合物转化为相应的酰胺化合物的能力，转化率对各种腈化合物来说均为100%。用气相或液相色谱法分析反应溶液，以测定生成的酰胺化合物量或消耗的腈化合物量。

表　　1

试验的腈化合物	转化率（%）
正丁腈	100
正戊腈	100
异丁腈	100
2－氯丙腈	100
丙烯腈	100
丁烯腈	100
3－氰基吡啶	100
4－氰基吡啶	100
丙二腈	100
丁二腈	100
己二腈	100

实施例8（反应4）

本例中检验了 Agrobacterium radiobacter SC-C15-1中所含腈水合酶对转化表2所列实施例7试验之外的试验用腈化合物为相应酰胺化合物的能力。为此，向实施例6中得到的粗酶溶液（60U）中加入0.05M磷酸盐缓冲液（20ml，PH7.7）和每种表2中所列的试验用腈化合物（1mmol）作为基质，使反应在30℃下进行3小时。结果发现，在 Agrobacterium

radiobacter SC-C15-1中所含的腈水合酶具有将试验的各种腈化合物均转化为相应的酰胺化合物的能力，而且转化率均为100%。反应溶液用气相或液相色谱分析，以确定生成的酰胺化合物量或消耗的腈化合物量。

表 2

试验的腈化合物	转化率（%）
乙腈	100
新戊腈	100
甲基丙烯腈	100
苄腈	100
2-氰基吡啶	100

如上所述，本发明能够在常温常压下通过使用土壤杆菌属微生物水合腈化合物的腈基，然后将其转化为相应的酰胺化合物来生产高纯度酰胺化合物。